植 物 分 类 与 资 源 学 报　2013, **35** (1): 48～54
Plant Diversity and Resources　　DOI: 10.7677/ynzwyj201312023

起始密码子区域相关序列多态性的开发及在苜蓿遗传多样性上的应用*

何庆元[1,2]，李正鹏[1]，吴　萍[1]，杨红燕[2]，王松华[1**]
(1 安徽科技学院生命科学学院，安徽 凤阳　233100；2 南京农业大学大豆研究所 国家大豆改良中心
作物遗传与种质创新国家重点实验室，江苏 南京　210095)

摘要：目前广泛使用的基于 PCR 基础的分子标记多为扩增非编码区域，或是随机基因组中扩增，在 QTL 定位中得到的位点一般与目标性状基因距离较远，我们开发了一个新的基于启动子序列目的基因型分子标记技术——启动子区域相关序列多态性（SCRP），试图使标记能够更为准确的反映不同品种的遗传基础。它利用启动子位置保守一致序列（“Kozak”序列）作为其上游引物，利用内含子富含“AATT”的特性，作为核心序列设计下游引物，上下游引物均为 18 bp，引物间通过组合配对的方式作为扩增引物对。设计了 14 条上游引物和 10 条下游引物，共 140 对引物组合，对 34 个苜蓿品种进行扩增，研究了 34 个苜蓿的遗传多样性。每个 PCR 反应产生 3～16 个 50～2 000 bp 的条带，结果表明该标记简单、可靠、具有较高多态性，并且扩增区域为一种目的基因型分子标记，在种质资源研究中具有重要价值。

关键词：遗传多样性；苜蓿；起始密码子区域相关序列多态性
中图分类号：Q 75，Q 16　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2095-0845(2013)01-048-07

Start Codon Region-related Polymorphism (SCRP): A Novel DNA Marker Technique for Assessing Genetic Diversity in Alfalfa Germplasm Collections

HE Qing-Yuan[1,2], LI Zheng-Peng[1], WU Ping[1], YANG Hong-Yan[2], WANG Song-Hua[1**]
(1 *Life Science College of Anhui Science and Technology University*, Fengyang 233100, China; 2 *National Center for Soybean Improvement*, *National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement*, *Nanjing Agricultural University*, Nanjing 210095, China)

Abstract: Mostly PCR-based molecular markers amplified non-coding regions, or the whole genome randomly, the locus is far away from the gene of targeted trait. We developed a novel marker technique called start codon region-related polymorphism (SCRP) aimed for the amplification of gene start condon regions. It is based on the use of two primers of 18 nucleotides. The forward primer is designed from the targeted “Kozak” sequence; and the other primer, the reverse primer is an arbitrary sequence with an AT-rich core to anneal with an intron. PCR amplification is applied for the first 5 cycles with an annealing temperature of 35 ℃, followed by 35 cycles with an annealing temperature of 50 ℃. In the present study, we utilized SCRP to study genetic diversity of 34 alfalfa cultivars (varieties). Each PCR reaction has generated as many as 3 to 16 fragments of 50 to 2 000 bp in size. The successful genetic diversity of 34 alfalfa cultivars by SCRP was achieved. This new technique should be useful in genotyping germplasm collections and in tagging genes govern desirable agronomic traits of crop plants.

Key words: Genetic diversity; *Medicago sativa*; Start Codon Region-related Polymorphism

* 基金项目：国家公益性行业（农业）科研专项“绿肥作物生产与利用技术集成研究及示范”（201103005）；安徽省教育厅重点项目（KJ2011Z066）；安徽科技学院校级重点学科（AKXK20102-1）资助项目
** 通讯作者：Author for correspondence; E-mail: shwang70@yahoo.com.cn
收稿日期：2012-02-17，2012-09-13 接受发表
作者简介：何庆元（1978-）男，助理研究员，在读博士，主要从事豆科植物遗传育种研究。E-mail: heqingyuan1@163.com

遗传标记，特别是分子标记已经广泛应用于动物、植物和微生物的遗传多样性评价和连锁图谱或重要农艺性状的 QTL 定位研究（Collard 等，2005；周荣等，2010）。自 Grodzicker 等（1974）开发出 RFLP 标记以来，已开发大量的基于 southern 杂交和 PCR 技术手段的分子标记，如 RAPD、SSR 和 AFLP 等（Williams 等，1990；Tautz，1989；Vos 等，1995）。然而，这些标记扩增的是非编码区域或随机分布于基因组中，标记位点一般与目标性状基因距离较远，导致 QTL 定位时，分子标记在应用上与其目标有一定的偏差。随着结构及功能基因组学的飞速发展，基于目的基因开发形成的目的基因标记和功能性分子标记成为一类新型分子标记类型。

随着许多物种的基因组序列的公布，这些数据将为新型分子标记的开发奠定坚实的基础（Holland 等，2001）。最近，已经开发了许多基于表达序列的分子标记，能够缩短标记性状与基因之间的距离，如：SRAP、SCoT、EST 标记（SSR-EST、EST-RFLP）、TRAP、CORAP 等（Li 和 Quiros，2001；Collard 和 Mackiu，2009；Hu 和 Vick，2003；Wang 等，2009）。限制这些标记的两个不利因素是高的经济成本和低的多态性，如 SRAP 只能标记 60% 的表达序列（Lu 等，2008）。

本研究以真核生物的起始密码子 ATG 为核心序列，以及启动子附近的保守序列设计上游引物（Kozak，1984）和以内含子富含“AATT”序列设计下游引物（Joshi 等，1997）。该标记设计以简单 PCR 反应为基础，上游是基因的 5′端启动子区域，下游引物是内含子序列，因此这种标记扩增获得的片段是开放性阅读框的一部分，具有简单、可靠、更容易获得目标基因，并且是共显性的标记。

紫花苜蓿素有“牧草之王”之称，是世界上栽培最广的牧草，也是中国分布最广、栽培历史较长、经营价值较高的豆科牧草。其适应性广泛，饲料营养价值高，具有较高的地上生物产量（Michaud 等，1988）。因其是多年生异花授粉同源四倍体作物（$2n=4x=32$），由于自交不亲和性，自交严重衰退（Armstrong，1954；Busbice 和 Wilsie，1966），因此从个体到群体水平上苜蓿的遗传基础都十分复杂，具有丰富的遗传多样性。从分子标记研究苜蓿的遗传多样性能够为苜蓿育种提供理论指导，过去利用 SSR、RAPD、SCoT 等分子技术研究了苜蓿的遗传多样性（Flajoulot 等，2005；毕玉芬等，2005；Vandemark 等，2006；何庆元等，2011，2012）。本研究在开发新的标记技术基础上，进一步从基因组水平上系统考察了不同秋眠型的 34 个苜蓿品种的遗传多样性，为明确不同品种间遗传关系、促进苜蓿合理引种及育种提供依据。

1　材料和方法

1.1　植物材料

材料为 34 个苜蓿品种，包括 32 个紫花苜蓿（*Medicago sativa*）品种和 2 个南苜蓿（*M. hispida*）品种，其来源、产地和秋眠型见表 1。

1.2　引物设计

Kozak（1984）和 Sawant 等（1999）研究表明在植物的起始密码子有一段 AGCCACCATGGC 的保守序列，根据这种保守序列，以此段序列为核心序列，在前面增加 3 个 GCC 的填充序列，在后面加 3 个选择性的碱基设计上游引物，目的是锚定表达基因的启动子。但如果仅以此作为引物，由于不同物种“Kozak”序列具有一定的差异，不能得到非常好的多态性。在此基础上，依据 Li 和 Quiros（2001）的原则，以内含子富含“AATT”的碱基（Lin 等，1999）为核心序列，前面增加 11 个 GACTGCGTACG 的填充序列，后面为 3 个选择性碱基，设计了 18 bp 的下游引物。以上下游引物组成引物对，分别进行扩增，结合了启动子密码和内含子扩增产生较好的多态，引物序列见表 2。

1.3　PCR 和凝胶电泳

在 20 μL 体系中含有 60 ng DNA 模板、1.4 μL 25 $mmol \cdot L^{-1}$ Mg^{2+}、1.0 U Taq 酶、0.15 $mmol \cdot L^{-1}$ dNTPs 和 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 浓度的引物。PCR 反应程序为 94 ℃ 预变性 3 min，然后 94 ℃ 变性 1 min、35 ℃ 退火 1 min、72 ℃ 延伸 1 min、5 个循环，接着 94 ℃ 1 min、50 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min、再进行 35 个循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min，4 ℃ 保存。扩增产物经 8% 非变性丙烯酰胺凝胶电泳，200 V 稳压电泳 1.5 h。电泳结束后进行银染：10% 乙醇和 0.5% 冰乙酸混合水溶液固定 12 ~ 15 min、0.2% 的 $AgNO_3$ 中染色 10 min、蒸馏水漂洗 2 次，置显影液（16 $g \cdot L^{-1}$ NaOH，甲醛 10.8 $mL \cdot L^{-1}$）中显影，直至条带清晰为止。

1.4　数据获取和分析

将 34 个苜蓿品种上扩增的条带转化为“0”和“1”数字符，同一位置有条带处以“1”表示，无条带以“0”表示，将其转化为“0”和“1”数字符，经 Nei 氏距离比较每对引物的扩增的结果（Nei 和 Li，1979），经 NTSYSpc2.1

软件进行相似性分析，并利用非加权组平均法（unweighted pair group with mathematic average，UPGMA）对所有供试苜蓿品种进行聚类分析后，将结果转化为树状图谱。

2 结果与分析

2.1 引物筛选和多态性分析

对140对引物进行扩增结果表明，77对引物在34个苜蓿品种上能扩增出有效片段，选取15对扩增片段多、亮度大、重复性好的引物，用于分子标记和遗传分析。共得到175个标记位点，其中150个为多态性位点，多态性频率达85.71%。不同引物能扩增出4～16个不同的位点，片段大小从50～2 000 bp，平均每对引物产生11.7个位点，不同引物的多态性频率有较大的

表1 供试的苜蓿品种

Table 1 Alfalfa cultivars in this experiment

序号 No.	品种名 Cultivar	秋眠级数 FDR	来源 Origin	序号 No.	品种名 Cultivar	秋眠级数 FDR	来源 Origin
1	四季旺 Siriver	9	Australia	18	阿尔冈金 Algonguin	2	Canada
2	新疆大叶 Xinjiang big leaf	5	China	19	WL323	4	America
3	维多利亚 Victoria	6	Germany	20	Nso-33	7	America
4	南苜蓿（安徽）*Medicago polymorpha* Linn.（Anhui）	1	China	21	超人 Superman	4	America
5	路宝 Lobo	5	America	22	Abacus	4	America
6	FGC-8201	4	America	23	Magna601	4	America
7	爱株+Z Abilene+Z	5	America	24	威拉 Vela	6	America
8	Quadrella	4	America	25	顶点 Dingdian	4	America
9	超级阿波罗 Superapolo	4	America	26	胜利者 Victory	4	America
10	特瑞 Terri	7	America	27	射手 Archer	4	America
11	新牧1号 XinmuNo. 1	1	China	28	苜蓿王 Alfaking	4	America
12	WL414	6	America	29	超级13R 13R Supreme	8	America
13	Rampage	1	America	30	驯鹿 Ac. caribou	1	America
14	AC. Norolica	4	America	31	德国大叶 German big leaf	unkown	China
15	南苜蓿（江苏）*Medicago polymorpha* Linn.（Jiangsu）	1	China	32	FGC-401	4	Australia
16	寒苜1号 Cold muNo. 1	1	Australia	33	德宝 Derby	4	America
17	金皇后 Golden Empress	3	America	34	猎人河 Hunter River	7	Australia

表2 SCRP所设计的引物

Table 2 SCRP primer sequences

引物编号 Primer code	正向引物 Forward primers（5′→3′）	引物编号 Primer code	反向引物 Reverse primers（5′→3′）
F1	GCCAGCCACCATGGCATG	R1	GACTGCGTACGAATTAAC
F2	GCCAGCCACCATGGCACT	R2	GACTGCGTACGAATTACG
F3	GCCAGCCACCATGGCACG	R3	GACTGCGTACGAATTAGC
F4	GCCAGCCACCATGGCACC	R4	GACTGCGTACGAATTATG
F5	GCCAGCCACCATGGCACA	R5	GACTGCGTACGAATTGAC
F6	CCCAGCCACCATGGCGCA	R6	GACTGCGTACGAATTGCA
F7	CCCAGCCACCATGGCGAC	R7	GACTGCGTACGAATTTAG
F8	CCAAGCCACCATGGCTGC	R8	GACTGCGTACGAATTTGA
F9	CCAAGCCACCATGGCTAG	R9	GACTGCGTACGAATTAAT
F10	CCAAGCCACCATGGCGCA	R10	GACTGCGTACGAATTTGC
F11	GCCAGCCACCATGGCGAA		
F12	GCCAGCCACCATGGCGAC		
F13	GCCAGCCACCATGGCGAG		
F14	GCCAGCCACCATGGCGAT		

差异，为 20.0% ~100.0%（表 3，图 1，2），说明 SCRP 能够应用于遗传多样性分析。

表 3　15 对引物在 34 个苜蓿品种上扩增的结果

Table 3　Amplification results from 15 pair of primer among thirty-four alfalfa cultivars

引物名称 Name of the primer	标记数 Number of amplified bands	多态数 Number of polymorphic bands	多态频率 Frequency of polymorphic bands/%
F_9-R_2	9	9	100.0
F_4-R_3	12	7	58.3
F_1-R_3	10	10	100.0
F_3-R_4	4	4	100.0
F_9-R_5	12	12	100.0
F_6-R_5	14	14	100.0
F_3-R_5	12	12	100.0
F_7-R_6	13	3	23.1
F_8-R_7	12	12	100.0
F_5-R_7	10	2	20.0
F_2-R_7	15	15	100.0
F_8-R_9	10	10	100.0
F_1-R_9	16	15	93.8
F_9-R_{10}	15	15	100.0
$F_{13}-R_{10}$	11	10	90.9
Total	175	150	
Average	11.7	10.0	85.7

2.2　遗传多样性分析

遗传的一致性和遗传距离是衡量群体遗传多样性的两个重要指标，Nso-33 和超人之间的相似性最高，相似系数达到 0.92，四季旺和来自江苏的南苜蓿之间以及爱株$^{+z}$和来自安徽的南苜蓿之间的相似性最低，相似系数为 0.64。

34 个苜蓿品种的聚类分析结果见图 3。从安徽凤阳和江苏南京采集的野生南苜蓿在相似系数 0.67 处单独聚为一类，其余 32 个品种在相似系数 0.703 附近分为 3 个亚群。第 1 亚群包括四季旺和新疆大叶苜蓿 2 个品种，第 3 亚群包括驯鹿、德国大叶 FGC-401，德宝，猎人河，一共 5 个品种，其余的 23 个品种都归为第 2 亚群。并且这些苜蓿品种的分类和地域来源没有太大的关系，同一地域来源的苜蓿品种被分别归到不同的类型中，说明育成的苜蓿品种材料来源较丰富，不能用单一的地域来源来判断其亲缘关系。

3　讨论

3.1　目的基因型分子标记开发

利用随机 DNA 标记，如 RAPD，SSR 或 RFLP 标记进行遗传作图和 QTL 定位时，经常发生标记和基因或 QTL 间发生重组和交换，导致标记和 QTL 间低的连锁水平（Andersen 和 Lubberstedt，2003）。目的基因标记基于等位基因之间的差异开发而成，主要是通过开放阅读框特征和利用 EST 序列来开发获得的一类标记。一个标记位点可以代表一个特定的基因，甚至与某种特定农艺性状联系起来。

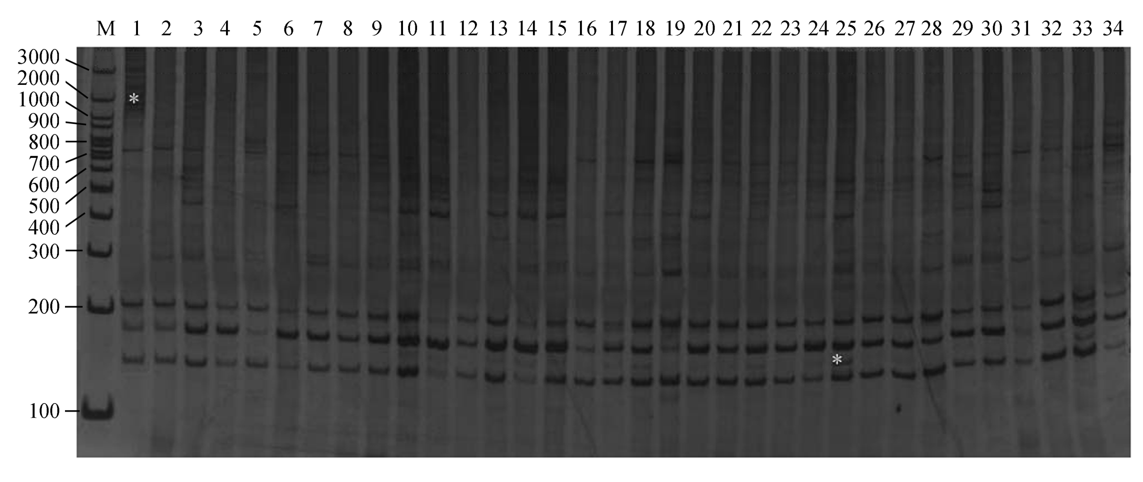


图 1　引物 F_5-R_7 在 34 份苜蓿品种上的扩增电泳图谱

图中各泳道电泳图为表 1 序号所对应样品的扩增产物，下同

Fig. 1　The profile of amplification products of the primer pair F_5-R_7 in 34 cultivars of alfalfa.

The profile of lane in figure is sample's amplification products of No. in table 1, as fellow

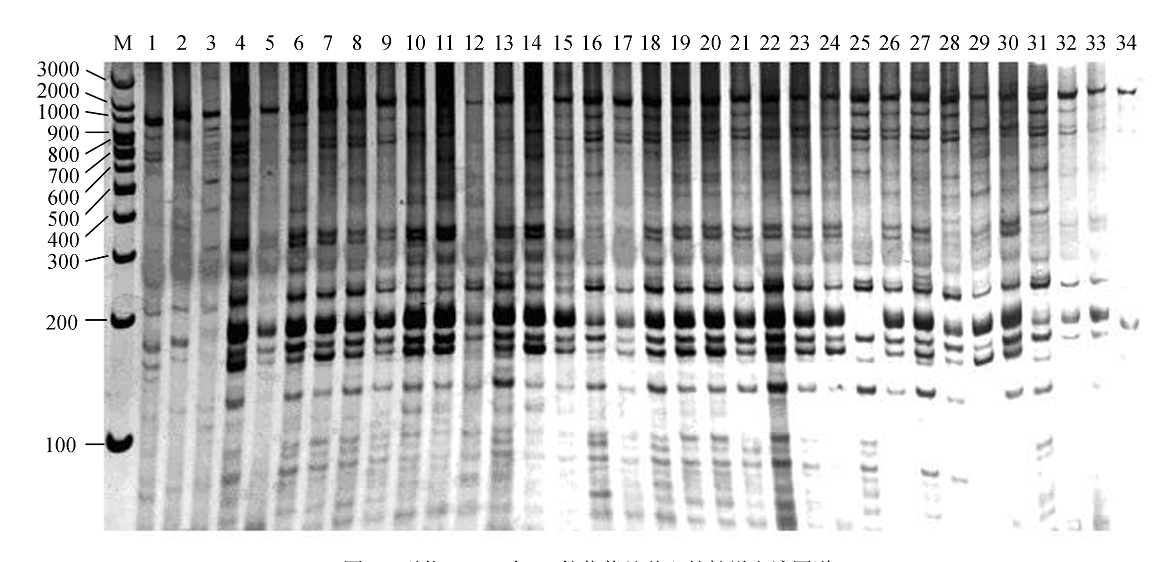


图2 引物 F_5-R_6 在34份苜蓿品种上的扩增电泳图谱

Fig. 2 The profile of amplification products of the primer pair F_5-R_6 in 34 cultivars of alfalfa

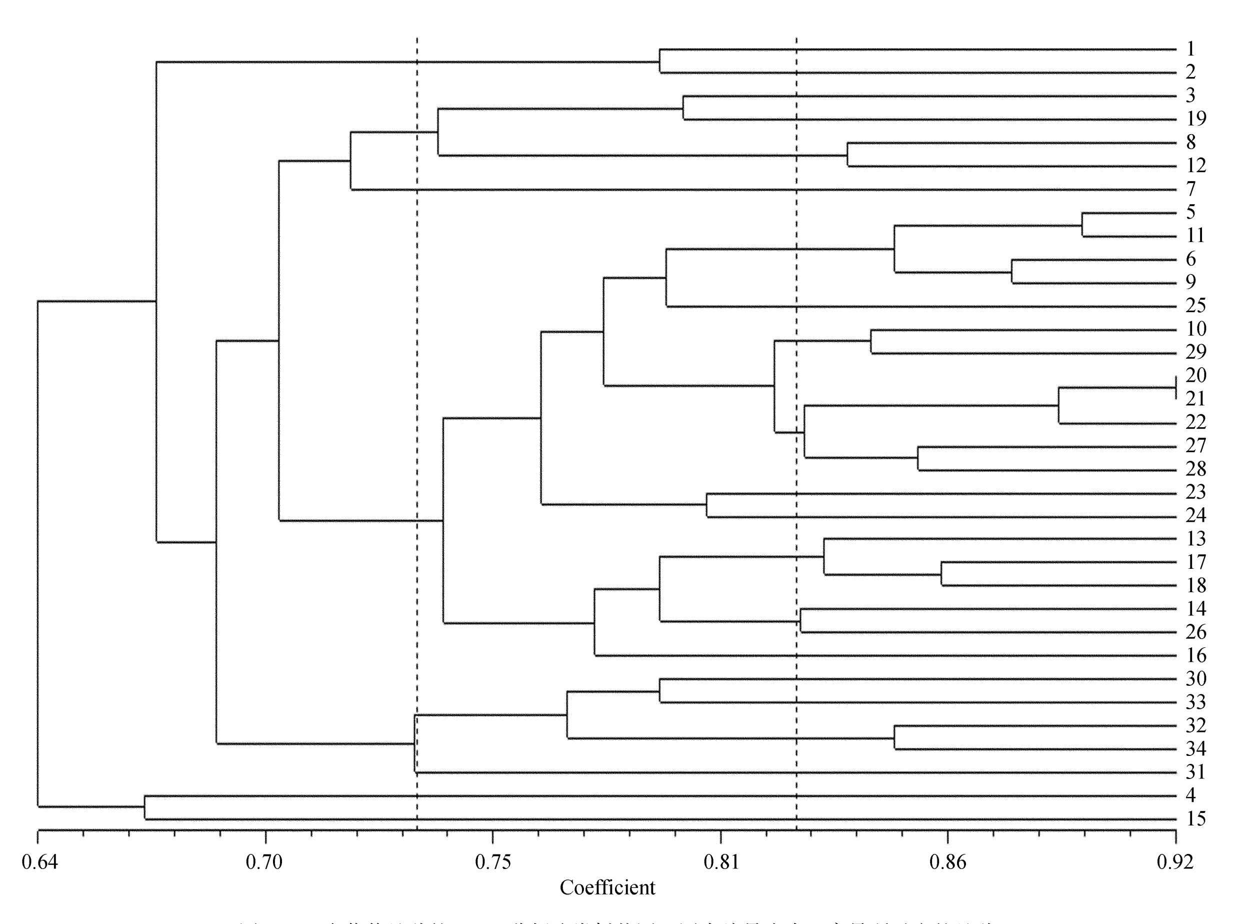


图3 34个苜蓿品种的SCRP分析聚类树状图。图中编号为表1序号所对应的品种

Fig. 3 UPGMA dendrogram of 34 cultivars of alfalfa based on 175 SCRP bands using Nei-Li's genetic similarity coefficients Corresponding to 1-34 cultivars in Table 1 respectively

SCRP技术的上游引物是锚定开放性阅读框的启动密码子ATG区域，下游引物是根据内含子富含“AATT”开发的一种新型目的基因型分子标记，这些序列在基因序列内部具有共通性，

即在启动子附近和内含子内这些碱基有很高的出现频率（Lin 等，1999；Bevan 等，1998）。该标记获得的扩增片段是一个完整开放性阅读框的部分序列，不同家系或基因型间产生的多态性反映了该基因本身的差异。因为它能够锚定到特定的基因位置，其 PCR 扩增获得的片段与表达基因有密切的相关。并且扩增的是启动子到内含子之间的一段，在扩增区域内，基因内部大于 5 bp 的 indel 的突变都可表现为产物的多态性。因此这种技术能够更好的鉴定遗传较为密切的不同物种之间的亲缘关系。

3.2　标记的稳定性

一般认为引物长度在 18～24 bp 时，PCR 具有较高的稳定性 Gillings 和 Holley（1997），TRAP 标记技术认为 18 bp 的引物设计具有更好的稳定性（Hu 和 Vick，2003）。SCRP 上下游都采用 18 bp 的引物，因此认为它比 RAPD 等具有更高的稳定性。我们利用这种技术在大豆重组自交系中进行检测，同样获得了很高的稳定性。

以往的研究表明引物的长度和扩增的退火温度是影响依赖 PCR 扩增的分子标记稳定性最重要的因素。退火温度是影响 PCR 扩增的重要因素，SCRP 扩增程序采用 SRAP 的扩增程序，能够保证起始阶段有一定的错配，然后在较高的退火温度（50 ℃）下保证扩增的稳定性。我们也试验了 CoRAP 的扩增程序，但是扩增的结果并不理想。这种显著的不一致表明 PCR 扩增需要选择合适的退火温度。

3.3　SCRP 的应用前景和优势

SCRP 结合了 SRAP 和 ScoT 标记的优点，是一种简单、有效和可靠的 DNA 标记技术。并且先前无需知道基因序列，具有快速简便的优点。它锚定的是 ATG 启动子转录到下游内含子之间的一段区域，因此能够直接反映基因内部的多态性，有望被广泛而高效地应用于高密度图谱的构建，QTL 检测，基因定位以及分子标记辅助育种等。

利用新的 SCRP 标记增加遗传图谱位点的数目，填补原有图谱在基因富集区的空缺，促进连锁图谱的加密，进一步对目的基因进行加密，提高了基因精细定位的效率，乃至图位克隆。它也可以在遗传资源的评价，遗传多样性研究上发挥重要的作用，并且能更加合理的反映不同基因型品种表达基因之间的遗传基础。

3.4　苜蓿的遗传多样性

紫花苜蓿异花授粉的同源四倍体，由于其自交衰退严重，品种的选育多以集团选择为主，同一个品种，各个个体间是异质的，是一个平衡群体，其同源四倍体特性，进一步增加了其遗传的复杂程度，在一个杂合个体中，每个等位基因都存在有 4 个复等位基因，因此不但在不同品种间，在同一品种内，乃至一个自交系中都存在丰富的遗传变异，利用不同类型的分子标记对其进行研究，能够进一步了解其遗传基础，为苜蓿育种服务。

〔参　考　文　献〕

Andersen JR，Lubberstedt T，2003．Functional markers in plants［J］．*Trends in Plant Science*，**8**（11）：554—560

Armstrong JM，1954．Cytological studies in alfalfa polyploids［J］．*Canadina Journal of Botany*，**32**（4）：531—542

Bevan M，Bancroft I，Bent E *et al*.，1998．Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*［J］．*Nature*，**391**（29）：485—488

Bi YF（毕玉芬），Che WG（车伟光），Li JR（李季蓉），2005．Genetic diversity analysis of weak-fall dormancy alfalfa［J］．*Acta Agronomica Sinica*（作物学报），**31**（5）：647—652

Busbice TH，Wilsie CP，1966．Inbreeding depression and heterosis in autotetraploids with application to *Medicago sativa* L［J］．*Euphytica*，**15**（1）：52—67

Collard BCY，Jahufer MZZ，Brouwer JB *et al*.，2005．An introduction to markers，quantitative trait loci（QTL）mapping and marker-assisted selection for crop improvement：the basic concepts［J］．*Euphytica*，**142**（1-2）：169—196

Collard BCY，Mackill DJ，2009．Start Codon Targeted（ScoT）polymorphism：a simple，novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants［J］．*Plant Molecular Biology Reporter*，**27**（1）：86—93

Flajoulot S，Ronfort J，Baudouin P *et al*.，2005．Genetic diversity among alfalfa（Medicago sativa）cultivars coming from a breeding program，using SSR markers［J］．*Theoretical and Applied Genetics*，**111**（7）：1420—1429

Gillings M，Holley M，1997．Amplification of anonymous DNA fragments using pairs of long primers generates reproducible DNA fingerprints that are sensitive to genetic variation［J］．*Electrophoresis*，**18**：1512—1518

Grodzicker T，Anderson C，Sharp PA *et al*.，1974．Conditional lethal mutants of adenovirus 2-simian virus 40 hybrids Ⅰ．host range mutants of Ad2 + ND1［J］．*Journal of Virology*，**6**：

1237—1244

He QY (何庆元), Wu P (吴萍), Zhang XH (张晓红) *et al.*, 2011. A study on optimization and primer screening of a SRAP reaction system and genetic diversity of different fall dormancy alfalfas [J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), **20** (2): 201—209

He QY (何庆元), Wang WB (王吴斌), Yang HY (杨红燕) *et al.*, 2012. Optimization of SCoT reaction system and genetic diversity of different fall dormancy alfalfa [J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), **21** (2): 133—140

Holland JB, Helland SJ, Sharopova N *et al.*, 2001. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat [J]. *Genome*, **44**: 1065—1076

Hu JG, Vick BA, 2003. Target region amplification polymorphism (TRAP): a novel marker technique for plant genotyping [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **21** (9): 289—294

Joshi CP, Zhou H, Huang XQ *et al.*, 1997. Context sequences of translation initiation codon in plants [J]. *Plant Molecular Biology*, **35** (6): 993—1001

Kozak M, 1984. Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs [J]. *Nucleic Acids Research*, **12** (2): 857—872

Li G, Quiros CF, 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **103** (2-3): 455—461

Lin XY, Kaul S, Rounsley S *et al.*, 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, **402**: 761—768

Lu CR, Yu SX, Yu JW *et al.*, 2008. Development and appraisement of functional molecular marker: intron sequence amplified polymorphism (ISAP) [J]. *Hereditas*, **30** (9): 1207—1216

Michaud R, Lehman WF, Rumbauch MD, 1988. World distribution and historical development [A]. In: Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (eds.), *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, *Agronomy Monograph Number 29* [M]. Madison, WI: ASA, CSSA, SSSA: 25—91

Nei M, Li WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **76** (10): 5269—5273

Sawant SV, Singh PK, Gupta SK *et al.*, 1999. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants [J]. *Journal of Genetics*, **78** (2): 123—131

Tautz D, 1989. Hypervariabflity of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **17** (16): 6463—6471

Vandemark GJ, Ariss JJ, Bauchan GA *et al.*, 2006. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms [J]. *Euphytica*, **152** (1): 9—16

Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA finger printing [J]. *Nucleic Acids Researchs*, **23** (21): 4407—4414

Wang QH, Zhang BL, Lu QS, 2009. Conserved region amplification polymorphism (CoRAP), a novel marker technique for plant genotyping in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27** (2): 139—143

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **18** (22): 6531—6535

Zhou R (周荣), Ren JJ (任吉君), Wang Y (王艳), 2010. Taxonomy study by fingerprint of POD and PPO isozymes in Brassica Vegetables [J]. *Acta Scientiarum Naturalum Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报) (自然科学版), **49** (4): 106—110